

УДК 616-002.1

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ АТФ-ЗАВИСИМЫЕ КАЛИЕВЫЕ КАНАЛЫ КАК ТОЧКА ПРИЛОЖЕНИЯ ДЕЙСТВИЯ ПРИ ДИСТАНТНОМ ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИИ

Л.М. Даниленко¹**М.В. Покровский²****А.Е. Королев²****В.И. Кочкаров¹****Т.А. Романова¹****И.А. Татаренкова²**¹ *Белгородский государственный университет*² *Курский государственный медицинский университет**e-mail: Danilenko_L@bsu.edu.ru*

При анализе реализации защитных механизмов preconditionирования обращает на себя внимание значительная роль АТФ-зависимых K^+ каналов (K_{ATP}). Их защитный потенциал связывают с гиперполяризацией мембраны, вследствие их открытия, активацией системы оксида азота, антиапоптотическими механизмами. Каналы этого типа располагаются на плазматической мембране нервных клеток, на внутренней мембране митохондрий, широко представлены в эндотелии и гладкомышечных клетках мозговых сосудов. В настоящее время многие исследователи склоняются к тому, что активация митохондриального АТФ-ингибируемого калиевого канала является одним из важных моментов в адаптации к гипоксии, что мы и попытались подтвердить в нашем исследовании при дистантном preconditionировании.

Ключевые слова: дистантное preconditionирование, ишемия и реперфузия, глибикломид, инфаркт миокарда.

Введение. Феномен локального ишемического preconditionирования миокарда, впервые описанный в конце 80-х годов Е. Мунгу и соавторами, подразумевает повышение устойчивости сердца к ишемическому повреждению после создания кратковременных эпизодов ишемии/реперфузии миокарда. Молекулярным механизмам локального preconditionирования посвящено большое количество публикаций, однако выраженный защитный потенциал данного феномена по целому ряду причин трудно применим в клинической практике. В то же время, гораздо более реальной представляется перспектива практического использования варианта preconditionирования миокарда, возникающего после короткого эпизода ишемии/реперфузии анатомически удаленного от сердца органа (почки, тонкой кишки, скелетной мышцы) и называемого дистантным ишемическим preconditionированием [9].

Механизмы дистантного preconditionирования в настоящее время изучены недостаточно. В частности, остается неизвестным, имеются ли принципиальные отличия в путях передачи кардиопротективного сигнала от ишемизированного органа к сердцу в зависимости от функциональных и анатомических особенностей данного органа. Ишемическое preconditionирование является общебиологическим механизмом и реализуется за счет активации АТФ-зависимых калиевых каналов в ответ на выделение аденозина, брадикинина опиоидов и др. [3] Свидетельством естественного механизма реализации является система многоуровневого иерархического дублирования, включающая нейрогенный компонент, гуморальный и внутриклеточный, связанный с дыханием в митохондриях [2, 10]. Последнее указывает на существование универсальной «фармакологической мишени» для запуска феномена preconditionирования. Например, несколько ишемических эпизодов в конечности приводит к активации пусковых механизмов антигипоксической системы организма, одним из которых является раскрытие чувствительных к АТФ калиевых каналов (K_{ATP}) в сарколемме миоцитов, которое вызывает в сердце укорочение длительности потенциала действия, приводя к уменьшению поступления кальция в миоциты. Это, в свою очередь, способствует уменьшению работы сердца и повышает выживаемость миокарда. Блокада этих каналов ослабляет протективный эффект классического ишемического preconditionирования [5, 11].

В связи с этим целью нашего исследования явилось определение роли АТФ-зависимых калиевых каналов в кардиопротекции при дистантном прекондиционировании.

Материалы и методы исследования Эксперименты выполнены на кроликах-альбиносах массой 1,5-2,0 кг. В качестве анестезии использовалось внутривенное введение хлоралгидрата в дозе (300 мг/кг). Дистантное прекондиционирование у животных проводили на правой задней конечности наложением жгута на проксимальную часть конечности в течение 10 мин. После прекондиционирования проводилась реперфузия в течение 20 минут. Затем моделировался инфаркт миокарда путем перевязки левой коронарной артерии (ЛКА). Эксперименты проводились при искусственной вентиляции легких через трахеостому. Доступ к сердцу производили путем торакотомии в четвертом межреберье слева, вскрывали перикард и, ориентируясь на медиальный край ушка левого предсердия слева и конус легочной артерии справа, определяли локализацию общего ствола ЛКА, под который с помощью атравматической иглы (6-0) подводили полипропиленовую лигатуру и перевязывали ЛКА. Для создания локальной обратной ишемии миокарда формировали окклюдер: концы лигатуры, охватывающие коронарную артерию, проводили в просвет полиэтиленовой трубки диаметром 1 мм и длиной 5-6 см, после чего путем смещения трубки добивались окклюзии ЛКА, а в противоположном направлении реперфузии. С целью поддержания окклюзии в течение 30 минут на трубку накладывали зажим. В течение эксперимента животное находилось на термостатируемом операционном столике; температура поддерживалась в пределах $37,0 \pm 0,5$ °C. Для блокады АТФ-зависимых каналов в условиях ишемии за полчаса до моделирования дистантного прекондиционирования внутривенно вводили не селективный блокатор АТФ-зависимых каналов глибенкломид (производитель Berlin-chemie) в дозе 10 мкМоль, предварительно растворив его в диметилсульфоксиде.

В ходе эксперимента у животных регистрировали электрокардиограмму в стандартных отведениях (I, II, III). Оценку размеров анатомической зоны инфаркта производили с помощью трифенилтетразолия хлорида (ТТХ), который выявляет дегидрогеназную активность клеток. Живая ткань миокарда в этом случае окрашена красным цветом, некроз выглядит белесым. После завершения реперфузии сердце быстро удаляли, разрезали в поперечном направлении на пять фрагментов одинаковой толщины (2 мм) и на 15 минут помещали в 1%-ный раствор ТТХ при температуре инкубации 37°C, затем сканировали и проводили расчет площадей зоны инфаркта для данного сердца на компьютере с помощью программы Adobe Photoshop 4.0. Данные по размерам зон инфаркта представляли в виде отношения объема зоны инфаркта к общему объему сердца, выраженного в процентах.

Результаты исследования и обсуждение. Результаты исследования показали, что размер зоны инфаркта в контрольной группе составил $26,60 \pm 1,4\%$, ишемическое дистантное прекондиционирование обладает выраженным инфаркт-лимитирующим действием и приводит к уменьшению размера инфаркта до $9,05 \pm 0,6\%$, локальное ишемическое прекондиционирование достоверно не отличалось от дистантного и составило $12,5 \pm 0,7\%$. Введение неселективного блокатора АТФ-зависимых каналов глибенкломида в дозе 10 мкМоль за полчаса до проведения дистантного прекондиционирования значительно увеличивало размер инфаркта миокарда до $23,46 \pm 1,06\%$ и мало отличалось от контрольной группы, подтверждая версию участия АТФ-зависимых каналов в дистантном прекондиционировании. Блокада этих каналов ослабляет кардиопротективный эффект дистантного прекондиционирования (рис. 1).

В сердце K^+ -АТФ-каналы в нормальных условиях находятся в закрытом состоянии и открываются только в ответ на метаболический стресс, который возникает, например, при ишемии [1, 12].

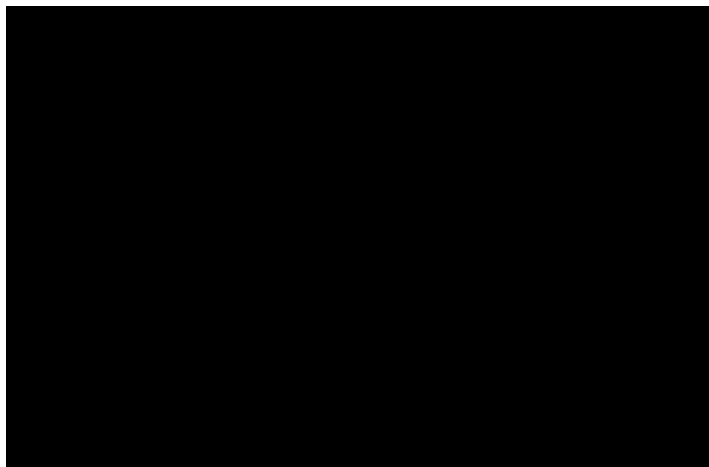


Рис. Размеры анатомической зоны инфаркта в экспериментальных группах при $p < 0,05$ по отношению к контролю

Дистантное preconditionирование миокарда, вызванное обратимой ишемией анатомически удаленного от сердца органа, не сопряжено с необходимостью создания ишемии миокарда и может быть выполнено путем неинвазивной процедуры одной из периферических артерий.

С этой точки зрения, дистантный вариант preconditionирования имеет явное преимущество перед локальным. В качестве дистантного ишемического стимула мы использовали наложение жгута на проксимальную часть задней конечности в течение 10 мин с последующей 20-минутной реперфузией. Дистантное preconditionирование обеспечивает, как и локальное, достоверный инфаркт-лимитирующий эффект, проявляющийся уменьшением размера зоны инфаркта.

Механизмы протекторного действия preconditionирования весьма разнообразны. Существуют три важных фактора: рецептор аденозина A1, комплексные киназы (в том числе протеин киназа C (PKC), митоген активируемая протеин киназа (МАРК) и тирозин киназы) и каналы калия, чувствительные к митохондрическому АТФ (КАТФ). Известно, что они играют наиболее важную роль в опосредованной preconditionированием кардиозащите. Активация PK-C в миоцитах желудочков сердца, а также синергическое действие аденозина и PK-C на каналы КАТФ приводит к укорочению длительности потенциала действия.

Для формирования целостных представлений о механизмах дистантного preconditionирования в нашем исследовании показано влияние АТФ-зависимых K^+ каналов на процессы кардиопротекции. При использовании неселективного блокатора АТФ-зависимых K^+ каналов глибенкламида полностью нивелировалось протективное действие дистантного preconditionирования на размер зоны инфаркта миокарда.

Модулируемое глибенкламидом закрытие K^+ -АТФ-каналов миокарда при острой ишемии блокирует физиологический ответ, развивающийся для предотвращения повреждения. Действуя на гладкомышечные клетки, глибенкламид может препятствовать расширению сосудов при ишемическом повреждении и тем самым нарушает нормальную реакцию периферического кровотока [4, 8].

Согласно современным представлениям, эндогенный кардиопротективный ответ, проявляющийся ростом устойчивости миокарда к ишемии-реперфузии, может быть индуцирован с помощью некоторых неишемических стимулов, не требующих инвазивного вмешательства. Данное направление находится в стадии интенсивной разработки и может включать использование некоторых фармакологических препаратов, имитирующих эффекты preconditionирования [7], и физических факторов, активирующих определенные звенья внутриклеточных сигнальных систем, ответственных за увеличение устойчивости миокарда к ишемии-реперфузии каналов [6].

Выводы. 1. Дистантное preconditionирование, как и локальное приводит к реализации достоверного инфаркт-лимитирующего эффекта, проявляющегося в уменьшении размера зоны инфаркта.

2. Предварительная блокада K^+ -АТФ каналов глибенкламидом полностью нивелирует кардиопротекторное действие дистантного preconditionирования.

Литература

1. Джахангиров, Т. Ш. Сахарный диабет как проблема современной кардиологии / Т. Ш. Джахангиров // Кардиология. – 2005. – Т. 45. – № 10. – 55-61.
2. Петрищев, Н. Н. Функциональное состояние эндотелия при ишемии-реперфузии (обзор литературы) / Н. Н. Петрищев, Т. Д. Власов // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. – 2000. – Т. 86. – № 2. – 148-163.
3. Писаренко, О. И. Ишемическое preconditioning: от теории к практике / О. И. Писаренко // Кардиология. – 2005. – Т. 45. – № 9. – 62-72.
4. Ardehali, H. Mitochondrial K(ATP) channels in cell survival and death / H. Ardehali, B.O'Rourke // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2005. – Vol. 39. – № 1. – P. 7-16.
5. Di Lisa, F. Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole / F. Di Lisa, P. Bernardi // Cardiovasc. Res. – 2006. – Vol. 70. – № 2. – P. 191-199.
6. Domenech, R. Non-ischemic myocardial preconditioning / R. Domenech, P. Macho // Mol. Cell. Biochem. – 2006. – Vol. 70. – № 2. – P. 191-199. 114.
7. Downey, J. M. Reducing infarct size in the setting of acute myocardial infarction / J. M. Downey, M. V. Cohen // Prog. Cardiovasc. Dis. – 2006. – Vol. 48. – № 5. – P. 363-371.
8. KATP channels in rat heart: blockade of ischemic and acetylcholine-mediated preconditioning by glibenclamide / Y. Z. Qian [et al.] // Am. J. Physiol. – 1996. – Vol. 271. – №1. – Pt .2. – P.H23-H28.
9. Subcellular localization of Suppressor of Hairless in Drosophila sense organ cells during Notch signaling / M. Gho, [et al.]. – Development. – 1993. – 122: 1673-82.
10. Role of sarcolemmal K(ATP) channels in cardioprotection against ischemia / M. Suzuki [et al.] /reperfusion injury in mice // J. Clin. Invest. – 2002. – Vol. 109. – № 4. – P. 509-516.
11. Preconditioning experiments showed that protecting mitochondrial integrity is highly associated with cell survival following ischemia / Racay et al. // Heart. – 2006. – Vol. 92. – № 5. – P. 619-624.
12. Intestinal ischemia preconditioning myocardium: role of protein kinase C and mitochondrial K(ATP) channel / Y.P. Wang et al // Cardiovasc. Res. – 2002. – Vol. 55. – № 3. – P. 576-582.

MITOCHONDRIAL ATP-DEPENDENT CHANNELS AS A POINT OF APPLICATIONS FOR DISTANT PRECONDITIONING

L.M.Danilenko¹
M.V.Pokrovskii²
A.E.Korolev²
V.I. Kochkarov¹
T.A. Romanova¹
I.A.Tatarenkova²

¹*Belgorod State University*

²*Kursk State Medical University*

e-mail: Danilenko_L@bsu.edu.ru :

Analyzing the implementation of the protective mechanisms of preconditioning noteworthy significant role of ATP – dependent K⁺ channels (KATP). Their protective potential associated with membrane hyper polarization, due to their discovery, activation of nitric oxide, and apoptotic mechanisms. Channels of this type are on the plasma membrane of nerve cells in the inner membrane of mitochondria, are well represented in the endothelium and smooth muscle cells of cerebral vessels. Currently, many researchers are inclined to believe that the activation of mitochondrial ATP-inhibited potassium channel is an important moment in adaptation to hypoxia that we tried to confirm in our study at distant preconditioning.

Key words: distant preconditioning, ischemia and reperfusion; glibenclamide, myocardial infarction.